

卢春绮,方浩,徐浩,等.酱香型白酒糟中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能评价[J].华中农业大学学报,2026,45(2):173-182.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2026.02.018

酱香型白酒糟中乳酸菌的分离鉴定及发酵性能评价

卢春绮¹,方浩^{2,3},徐浩¹,余杭^{3,4},江友峰¹,梁运祥^{2,3},吴未¹,李英俊^{2,3}

1. 贵州茅台酒厂(集团)循环经济产业投资开发有限公司,遵义 563000;

2. 华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070;

3. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室,武汉 430070;

4. 华中农业大学动物科学技术学院、动物医学院,武汉 430070

摘要 为开发适用于酱香型白酒糟的专用发酵菌剂,采用分级筛选策略对酒糟中乳酸菌进行分离鉴定与发酵性能评价。通过溴甲酚紫平板法初筛产酸菌株,结合形态学、革兰氏染色与16S rRNA测序进行鉴定;测定菌株乙醇耐受性(5%~15%),并系统评估其耐酸性(pH 2.0~6.0)、温度适应性(20~60℃)、体外安全性(溶血性与药敏性)及固态发酵性能。结果显示,从酒糟中分离鉴定出24株乳酸菌,分属乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、戊糖片球菌(*Pediococcus pentosaceus*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、布氏乳杆菌(*Lentilactobacillus buchneri*)和嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)5个物种。在8%乙醇胁迫下,乳酸片球菌F8、副干酪乳杆菌F16与布氏乳杆菌F18存活率仍维持在10%左右;多数菌株在pH 3.0~6.0处理2 h后存活率超过60%。优势菌株在30~37℃生长良好,无溶血活性,且对多数抗生素敏感。固态发酵显示,副干酪乳杆菌F16在70%酒糟基质中发酵48 h后活菌数达 7.33×10^9 CFU/g,显著优于其他菌株。研究表明,筛选出的3株兼具优良耐逆性、安全性及高效发酵性能的乳酸菌,可为酱香型白酒糟的高值化利用与专用发酵剂开发提供核心菌种资源与技术依据。

关键词 酱香型白酒糟;乳酸菌;耐酸特性;发酵;乳酸菌发酵剂;安全性评价

中图分类号 TS201.3;TQ920.6 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2026)02-0173-10

酱香型白酒糟是酱香型白酒酿造的主要副产物,富含发酵过程中未被微生物利用完的营养物质以及蛋白含量较高的微生物菌体^[1]。我国是酿酒大国,2024年我国白酒年产量约为414.5万m³,每生产1 000 L白酒约产生3~4 t白酒糟,即2024年我国白酒糟产量可达1 243万~1 658万t。酒糟含水量大、酸度高,且具有丰富的营养成分,导致其不易储存和运输,若不进行处理而直接丢弃,不仅会造成酒糟资源的巨大浪费,还会对环境造成严重污染,因此,如何高效利用酒糟是目前亟待解决的问题^[2-3]。

微生物发酵酒糟是通过特定菌群的生物转化作用,将酒糟中的大分子物质降解为小分子营养物质的过程^[4],将鲜酒糟和菌种充分混合后进行固态发酵,不仅能够提高酒糟中营养成分的含量,同时便于储存和运输。目前,应用于酒糟发酵的微生物主要

有酵母菌、乳酸菌、芽孢杆菌、放线菌等,这些微生物均参与酱香型白酒生产过程,但研究表明,乳酸菌属是发酵过程以及发酵酒糟中的关键细菌属^[5-7],同时乳酸菌在酒糟资源化利用(如饲料发酵、食品添加剂等)方面展现出可观潜力^[8-10],然而,目前针对这一特殊生境来源、兼具耐酸、温度适应性及安全性的乳酸菌,其系统筛选与针对性应用研究仍较为缺乏。

本研究从酱香型白酒糟中,定向选育出适用于高酸、高乙醇环境的专用乳酸菌发酵剂。通过分离并鉴定酒糟中的产酸微生物,以乙醇耐受性为核心进行复筛,并对优势菌株开展耐酸、耐温及体外安全性(溶血性与抗生素敏感性)等评价试验,最后通过固态发酵实验验证其实际应用潜力,旨在为合理利用酒糟资源提供科学依据,从而促进我国白酒产业

收稿日期:2025-07-14

基金项目:贵州茅台酒厂(集团)循环经济产业投资开发有限公司-华中农业大学横向课题(XHFW2024031)

卢春绮,E-mail:6210208036@stu.jiangnan.edu.cn

通信作者:李英俊,E-mail:yingjun@mail.hzau.edu.cn

的发展。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

1) 样品来源。试验所用新鲜酱香型白酒糟(含水量56%~60%)及干白酒糟(含水量8%左右)均由贵州茅台酒厂提供,样品采集后于-20℃条件下保存。

2) 试剂。主要试剂包括无水乙醇、盐酸、葡萄糖等(国药集团);蛋白胨、酵母浸粉(安琪酵母);Polymerase Chain Reaction(PCR)相关试剂(艾科瑞、生工生物);琼脂(BIOFROXX);革兰氏染色试剂盒(珠海贝索);哥伦比亚培养基(海博生物),药敏纸片(杭州微生物公司),其规格(药物含量)分别为:利福平(rifampin, RA) 5 μg/片;链霉素(streptomycin, S) 10 μg/片;万古霉素(vancomycin, VAN) 30 μg/片;阿莫西林(amoxicillin, AMX) 20 μg/片;卡那霉素(kanamycin, KAN) 30 μg/片;阿米卡星(amikacin, AMK) 30 μg/片;庆大霉素(gentamicin, GM) 10 μg/片;氨苄西林(ampicillin, AMP) 10 μg/片;红霉素(erythromycin, E) 15 μg/片;氯霉素(chloramphenicol, C) 30 μg/片;克林霉素(clindamycin, CC) 2 μg/片;四环素(tetracycline, TET) 30 μg/片;亚胺培南(imipenem, IPM) 10 μg/片。

3) 仪器。SJ-CJ-2FD型双人单面净化工作台;BM2000生物显微镜;立式自动电热压力灭菌锅,合肥华泰医疗设备有限公司;SPL-250/SPL-80生化培养箱,天津莱玻特瑞仪器有限公司;电子天平,上海精密仪器仪表有限公司;TC-KP-D BIO基因扩增仪,杭州博日科技有限公司;OXFORD移液器;XW-80A漩涡混合器;PHS-3CpH计;U-T3C紫外可见分光光度计;ZQPI-200立式全文振荡培养箱。

4) 培养基。MRS肉汤培养基:葡萄糖2%、蛋白胨1%、酵母浸粉0.4%、磷酸氢二钾0.2%、柠檬酸三铵0.2%、三水合乙酸钠0.5%、七水合硫酸镁0.02%、一水合硫酸锰0.005%、牛肉浸膏0.5%、吐温-80 0.1%;蒸馏水定容到1000 mL,调节pH至6.2~6.4,115℃灭菌20 min^[11]。

MRS固体培养基:向MRS肉汤培养基中加入1.6%的琼脂。筛选MRS固体培养基:向MRS固体培养基中加入0.08%溴甲酚紫。

固体发酵培养基:70%(干物质)酒糟、28%(干物质)麸皮、2%(干物质)碳酸钙,料水比1:1

(g: mL)。

1.2 试验方法

1) 产酸微生物分离纯化。取10 g鲜酒糟加入90 mL无菌生理盐水,37℃、180 r/min振荡15 min。随后进行梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-5}),取100 μL 10^{-2} ~ 10^{-5} 稀释液涂布于含溴甲酚紫的MRS平板,37℃培养48 h。挑取产酸变黄的单菌落,反复划线纯化3~4代,纯化菌株用50%甘油于-80℃保存^[12]。

2) 分离菌株形态鉴定。对纯化菌株进行革兰氏染色,观察细胞形态、大小、染色特性及排列方式,作为初步分类依据^[13]。

3) 乳酸菌16S rRNA基因序列扩增与遗传分析。使用细菌通用引物为上游引物27F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';下游引物1492R:5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3'。

PCR反应体系:2×Power Taq PCR MasterMix 10 μL,上游引物27F/下游引物1492R各1 μL,DNA模板1 μL,补充ddH₂O至20 μL。PCR扩增程序:95℃ 5 min;95℃ 30 s;51℃ 30 s;72℃ 90 s;30个循环;72℃延伸10 min。PCR产物送上海生工进行测序,结果经NCBI BLAST比对,并利用MEGA11构建系统发育树^[14-15]。

4) 菌株耐乙醇试验测定。将鉴定后的代表性乳酸菌以2%接种量接入含不同乙醇体积分数(0%、5%、8%、10%、12%、15%, V/V)的MRS液体培养基中。其中,8%乙醇作为关键筛选阈值,既模拟酒糟环境中乙醇含量的上限,也具备良好的筛选区分度。37℃振荡培养12 h后,梯度稀释涂布于MRS平板,37℃培养48 h后进行菌落计数。存活率= $N_i/N_0 \times 100\%$, N_0 和 N_i 分别为未添加乙醇和添加不同乙醇含量胁迫后的活菌数,CFU/mL^[16-17]。

5) 菌株温度耐受性的测定。将优势菌株按2%(V/V)的接种量接种于MRS肉汤培养基,37℃培养至对数后期。取1 mL菌悬液于无菌离心管中,分别在20、30、37、50、60℃水浴中精确处理10 min。处理结束后,立即将样品置于冰上冷却以终止热胁迫。随后,对样品进行10倍系列梯度稀释,选取合适的稀释度,吸取100 μL菌液涂布于MRS固体平板。将平板置于37℃恒温培养箱中培养48 h后进行菌落计数。以未经温度处理(通常指在最适生长温度下培养,即37℃)的样品活菌数作为对照(N_B),根据公式计算菌株在不同温度下的存活率:存活率= $N_A/N_B \times 100\%$, N_A 和 N_B 分别为经温度胁迫后和未经胁迫的

对照活菌数,CFU/mL^[18]。

6) 菌株体外安全性试验:溶血活性。用灭菌的接种环挑取优势菌株单菌落,在哥伦比亚血琼脂平板上划线,以金黄色葡萄球菌作为阳性对照,37℃培养48 h后根据菌落颜色和形态确定菌株是否溶血和溶血类型, α -溶血即菌落周围有草绿色溶血环, β -溶血即菌落周围有透明溶血环, γ -溶血即菌落周围没有溶血环^[19]。

7) 菌株体外安全性试验:药敏试验。本研究对优势菌株进行13种抗生素包括利福平(RA)、链霉素(S)、万古霉素(VAN)、阿莫西林(AMX)、卡那霉素(KAN)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GM)、氨苄西林(AMP)、红霉素(E)、氯霉素(C)、克林霉素(CC)、四环素(TET)、亚胺培南(IPM)的抗药性检测。

将培养至对数期的菌株离心,弃去上清,菌体用PBS重悬至浓度为 10^8 CFU/mL,吸取100 μ L菌悬液涂布至MRS固体培养基表面,用镊子将药敏片贴在涂有菌悬液的固体培养基表面,每个样品3个平行处理,静置5 min后翻转平皿并密封处理,37℃培养24 h,使用游标卡尺测量抑菌圈直径,并计算平均值,参照CLSI标准判断待测菌药敏性^[20]。

8) 菌株耐酸能力的测定。选取在8%乙醇下存活率较高的优势菌株,评估其在不同pH(2.0~6.0)条件下的耐受性。用1 mol/L HCl调节MRS液体培养基至目标pH,菌株培养至对数期后,离心洗涤并重悬于无菌生理盐水(1×10^8 CFU/mL)。取1 mL菌悬液加入9 mL不同pH培养基(终浓度 1×10^7 CFU/mL),37℃静置处理,于0、2、4 h取样,梯度稀释涂布计数,计算存活率^[21-22]。

9) 菌株发酵性能测定。选取耐乙醇和耐酸综合评价优良的优势菌株。按固体发酵配方配制固态发酵培养基,1 mol/L NaOH调节初始pH至5.5~6.0。每袋装料30 g,28℃发酵48 h。发酵结束后取10.0 g发酵后样品加入90 mL无菌生理盐水,振荡混匀。梯度稀释(10^{-1} ~ 10^{-6}),采用微量点滴法分别吸取5 μ L 10^{-1} ~ 10^{-6} 稀释液点种于MRS固体培养基划分的九宫格区域,置于37℃恒温培养箱中培养48 h,观察每格的菌落数后选择合适的梯度吸取100 μ L稀释液涂布在MRS固体培养基上,培养48 h后计数,计算湿发酵基质的活菌数,CFU/g。

10) 优势菌株生长曲线测定。将优势菌株接种于MRS液体培养基,37℃培养12~15 h后,以2%

(V/V)转接至100 mL新鲜液体培养基,37℃、180 r/min振荡培养。每2 h取样测定OD₆₀₀,绘制生长曲线^[23]。

1.3 数据分析

试验数据用Excel/WPS整理,Origin 2025进行绘图和单因素方差分析。若组间差异显著($P < 0.05$),则进一步采用Duncan's多重范围检验进行多重比较。数据以“均值±标准差”表示。序列分析使用NCBI BLAST和MEGA 11。

2 结果与分析

2.1 产酸微生物的分离鉴定与多样性分析

通过溴甲酚紫指示剂平板从酱香型白酒糟中初筛得到约100株产酸单菌落,经纯化后对51株菌进行16S rRNA基因扩增与测序。结合形态学与序列比对(图1),最终确认24株为乳酸菌,分属5个种(表1),包括乳酸片球菌(F1~F11,F52~F59)、戊糖片球菌(F23)、副干酪乳杆菌(F16、F17)、布氏乳杆菌(F18)和嗜酸乳杆菌(F24)。所有乳酸菌16S rRNA序列与模式菌株相似性均高于99%,系统发育树显示其与对应模式菌株聚类紧密;其余27株为非乳酸菌,主要为醋酸杆菌与芽孢杆菌等。乳酸片球菌在数量上占优,为后续耐受性筛选奠定了菌种基础。在获得纯化鉴定的乳酸菌资源后,进一步对其在酒糟高乙醇环境下的生存能力进行了评估。

2.2 乳酸菌的耐乙醇性能分析

选取乳酸片球菌F8、戊糖片球菌F23、副干酪乳杆菌F16、布氏乳杆菌F18与嗜酸乳杆菌F24进行乙醇耐受性测试。如图2所示,在5%乙醇条件下,多数菌株存活率较高;在关键8%乙醇含量的胁迫下,戊糖片球菌F23、乳酸片球菌F8、副干酪乳杆菌F16与布氏乳杆菌F18等菌株的相对存活率仍维持在10%以上,因此,被确定为本阶段的优势菌株。当乙醇含量提升至10%以上时,所有测试菌株存活率降至1%以下。基于乙醇耐受性结果,筛选出副干酪乳杆菌F16、乳酸片球菌F8、戊糖片球菌F23和布氏乳杆菌F18等4株优势菌株,并后续对它们的环境耐受性与安全性进行系统评价。

2.3 乳酸菌的温度耐受性分析

由图3可知,乙醇耐受复筛获得的4株优势乳酸菌在60℃处理时,活菌数均急剧下降,表明在60℃时各乳酸菌均不耐温,各乳酸菌基本上都能够在

表1 酱香型白酒糟中分离菌株的鉴定结果

Table 1 Identification results of microbial strains isolated from sauce-flavor Baijiu distillers' grains

菌株编号 Strain number	细胞形态 Cell morphology	革兰氏染色 Gram stain	物种鉴定结果 Species identification
F1~F11、F52~F59	球状 Coccus	+	<i>Pediococcus acidilactici</i>
F23	球状 Coccus	+	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
F16、F17	杆状 Rod	+	<i>Lactobacillus paracasei</i>
F18	杆状 Rod	+	<i>Lentilactobacillus buchneri</i>
F24	杆状 Rod	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
F25~F40、F42~F44	杆状 Rod	+	<i>Acetobacter pasteurianus</i>
F41	杆状 Rod	+	<i>Acetobacter pomorum</i>
F45、F47~F50	杆状 Rod	+	<i>Heyndrickia oleronia</i>
F46、F51	杆状 Rod	+	<i>Bacillus oleronius</i>

注 Note: +: 革兰氏阳性 Gram-positive.

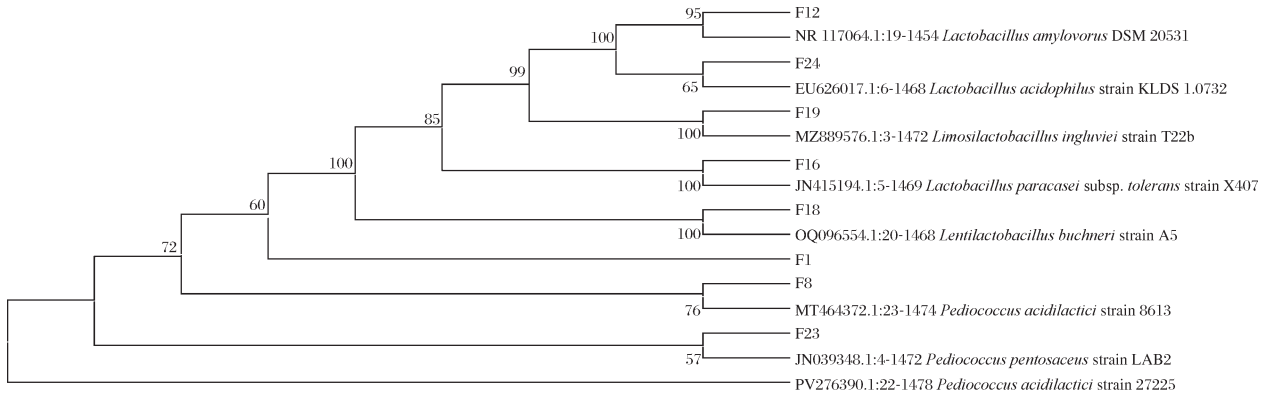


图1 基于16S rRNA基因序列的乳酸菌系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences

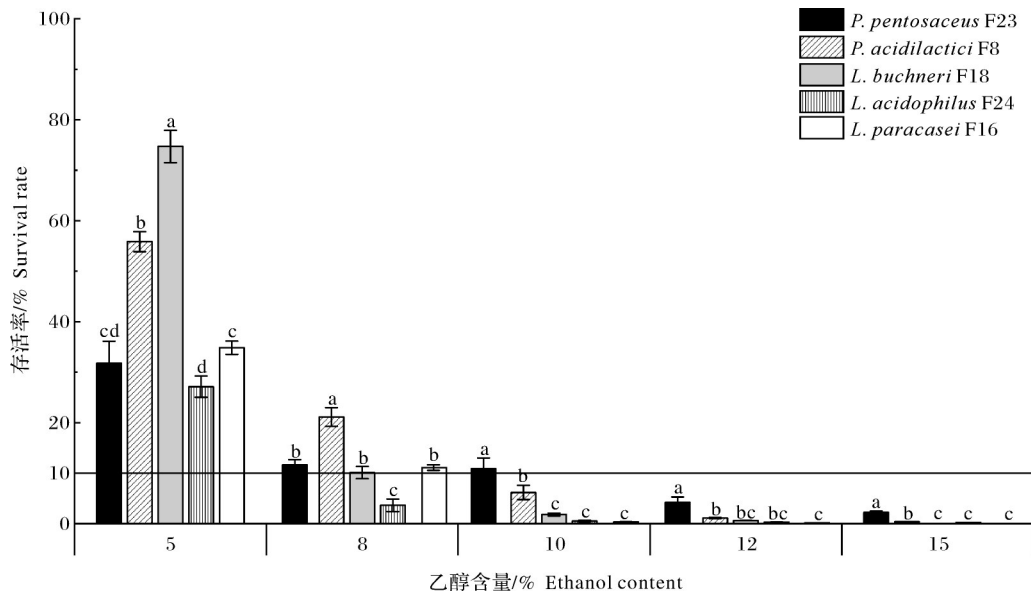


图2 乳酸菌菌株在不同乙醇含量胁迫下的存活率

Fig.2 Survival rates of lactic acid bacteria strains under ethanol stress with different concentrations

30~37 °C时正常生长,耐温性表现较好,而20、50 °C活菌数都有不同程度下降,表明在该温度下对乳酸菌的正常生长产生负面作用。

2.4 乳酸菌的体外安全性评价:溶血活性

对乙醇耐受复筛获得的4株优势乳酸菌菌株溶血试验的结果如图4所示。某些情况下乳酸菌可能

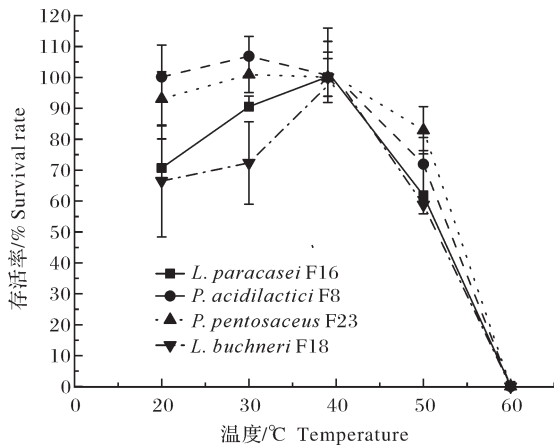


图3 乳酸菌菌株在不同温度处理后的存活率

Fig.3 Survival rates of lactic acid bacteria strains under different temperature treatments

会成为潜在的溶血性细菌,严重者将会引起败血症的发生,因此,溶血性检测是乳酸菌必须要测定的指标之一。培养48 h后的4株乳酸菌在血平板均无溶血现象出现,表明均无溶血能力。溶血性检测后,进一步通过药敏试验评估这些菌株的抗生素耐药性谱,以全面衡量其潜在生物安全风险。

2.5 乳酸菌的体外安全性评价:抗生素敏感性

根据表2乳酸菌菌株的抗生素敏感性试验结果可知,通过乙醇耐受复筛获得的4株优势乳酸菌菌株(副干酪乳杆菌F16、乳酸片球菌F8、戊糖片球菌F23及布氏乳杆菌F18)对多数测试抗生素(如利福平、万古霉素、阿莫西林、庆大霉素、氨苄西林、红霉素、氯

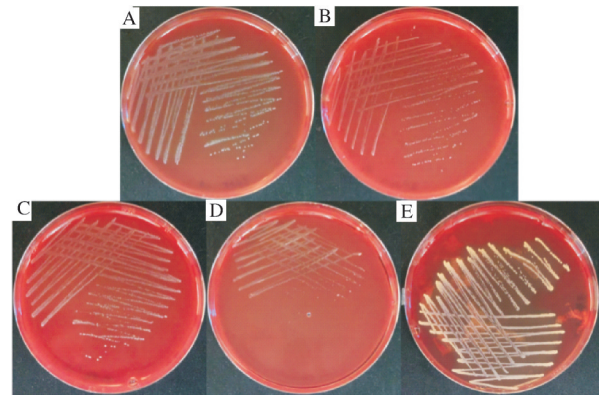


图4 乳酸菌菌株的溶血性检测结果
Fig.4 Hemolytic activity assay of lactic acid bacteria strains

图4 乳酸菌菌株的溶血性检测结果

Fig.4 Hemolytic activity assay of lactic acid bacteria strains

霉素、克林霉素、四环素和亚胺培南)均表现敏感;然而,对于氨基糖苷类抗生素(链霉素、卡那霉素和阿米卡星),前3种菌株均表现为耐药,而布氏乳杆菌F18则均表现为中介,显示出其对抗生素敏感性相对更优。在完成安全性评价的基础上,重点研究这些优势菌株的耐酸能力。

2.6 乳酸菌的耐酸性能分析

对4株优势菌(乳酸片球菌F8、戊糖片球菌F23、副干酪乳杆菌F16与布氏乳杆菌F18)的耐酸性测试表明,酸胁迫时间与强度(pH)对存活率均有明显影

表2 乳酸菌菌株的抗生素敏感性

Table 2 Antibiotic susceptibility of lactic acid bacteria strains

药物名称 Drug names	乳酸菌菌株对不同抗生素产生抑菌圈直径/mm(敏感程度) Inhibition zone diameter(susceptibility profile of lactic acid bacteria strains to various antibiotics)			
	副干酪乳杆菌F16 <i>L. paracasei</i> F16	乳酸片球菌F8 <i>P. acidilactici</i> F8	戊糖片球菌F23 <i>P. pentosaceus</i> F23	布氏乳杆菌F18 <i>L. buchneri</i> F18
	利福平 RA	27.0±3.5 S	25.0±1.0 S	24.0±1.0 S
链霉素 S	6.0±0.0 R	6.0±0.0 R	8.0±3.5 R	16.3±0.6 I
万古霉素 VAN	21.3±1.5 S	22.7±0.6 S	27.0±2.6 S	20.7±0.6 S
阿莫西林 AMX	33.7±3.2 S	20.7±1.2 S	24.0±1.0 S	35.7±1.5 S
卡那霉素 KAN	6.0±0.0 R	6.0±0.0 R	6.0±0.0 R	16.3±0.6 I
阿米卡星 AMK	7.7±2.1 R	6.0±0.0 R	8.7±2.5 R	18.0±0.0 I
庆大霉素 GM	25.0±4.4 S	19.0±2.0 S	20.3±0.6 S	28.0±0.0 S
氨苄西林 AMP	25.7±1.5 S	18.7±1.2 S	16.3±1.2 S	27.3±0.6 S
红霉素 E	29.0±2.6 S	26.0±2.0 S	25.0±1.7 S	32.7±0.6 S
氯霉素 C	31.7±1.2 S	29.7±1.5 S	30.3±0.6 S	34.3±1.2 S
克林霉素 CC	30.0±1.0 S	30.0±0.0 S	30.0±1.0 S	31.7±0.6 S
四环素 TET	28.7±1.2 S	23.0±2.0 S	19.0±1.0 S	19.3±0.6 S
亚胺培南 IPM	25.7±0.6 S	28.0±1.0 S	33.7±1.5 S	38.0±1.0 S

注 Note: S:敏感 Susceptible; I:中介 Intermediate; R:耐药 Resistant.

响(图5)。从时间维度看,延长胁迫时间至4 h,各pH条件下的存活率均较2 h时进一步下降,显示出酸损伤的累积效应。从酸度维度看,在同一时间点,pH越低则杀伤作用越强。例如,处理2 h时,pH 2.0下的存活率[(12.7±3.0)%~(48.6±4.0)%]远低于pH

3.0~6.0下的存活率[多数>(62.7±6.0)%];至4 h,pH 2.0下的存活率已大幅降至(1.8±5.0)%~(12.3±7.0)%。综合而言,布氏乳杆菌F18在pH 3.0~6.0范围内于2个时间点的存活率均高于其他菌株,表现出更稳定的耐受性。

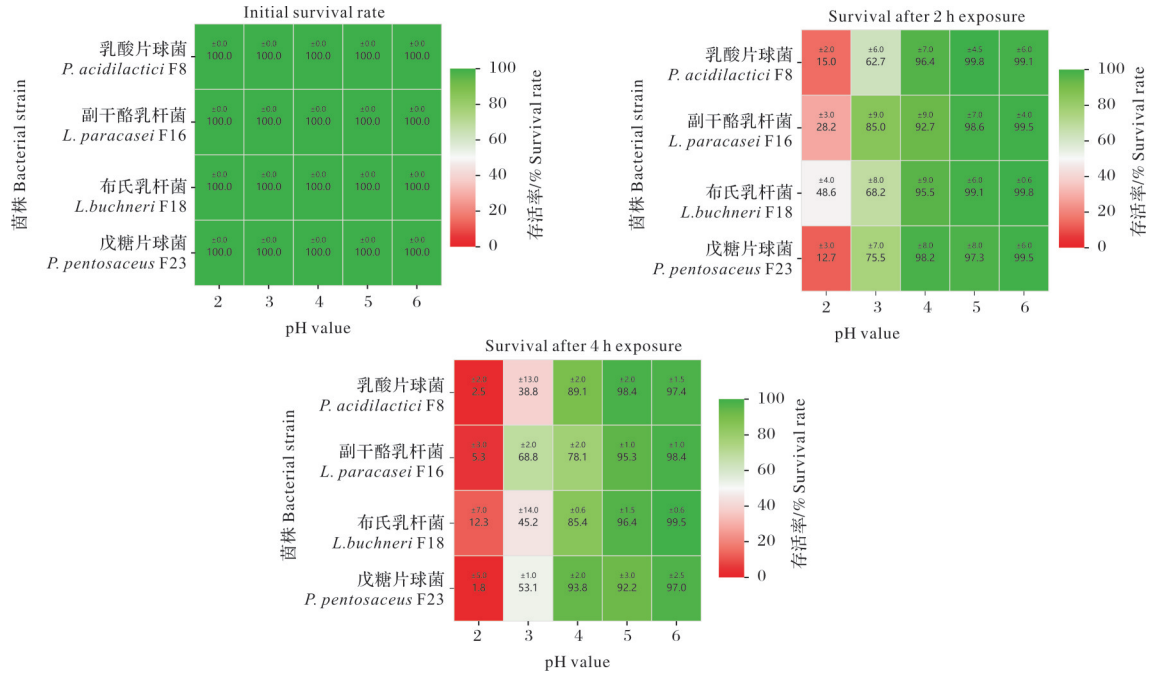


图5 乳酸菌菌株在不同pH胁迫下的存活率热图

Fig.5 Heatmap of survival rates of lactic acid bacteria strains under different pH stresses

2.7 乳酸菌在酒糟基质中的固态发酵性能

基于耐受性综合评价,进一步评估了乳酸片球菌F8、副干酪乳杆菌F16与布氏乳杆菌F18在酒糟-麸皮固态基质中的发酵性能(图6)。随着酒糟比例从10%增至90%,3株菌的湿基发酵物中活菌数均呈下降趋势。在酒糟含量70%下,副干酪乳杆菌F16的活菌数达到 7.33×10^9 CFU/g,显著高于乳酸片球菌F8的 3.21×10^9 CFU/g和布氏乳杆

菌F18的 3.85×10^9 CFU/g($P < 0.05$)。同样,在酒糟比例80%下,副干酪乳杆菌F16的活菌数 6.02×10^9 CFU/g也显著高于乳酸片球菌F8的 2.15×10^9 CFU/g和布氏乳杆菌F18的 2.98×10^9 CFU/g($P < 0.05$)。在酒糟含量90%下,副干酪乳杆菌F16的活菌数 4.91×10^9 CFU/g依然保持显著优势($P < 0.05$)。上述结果表明,副干酪乳杆菌F16在高含量酒糟基质中具有突出的适应性与发酵效

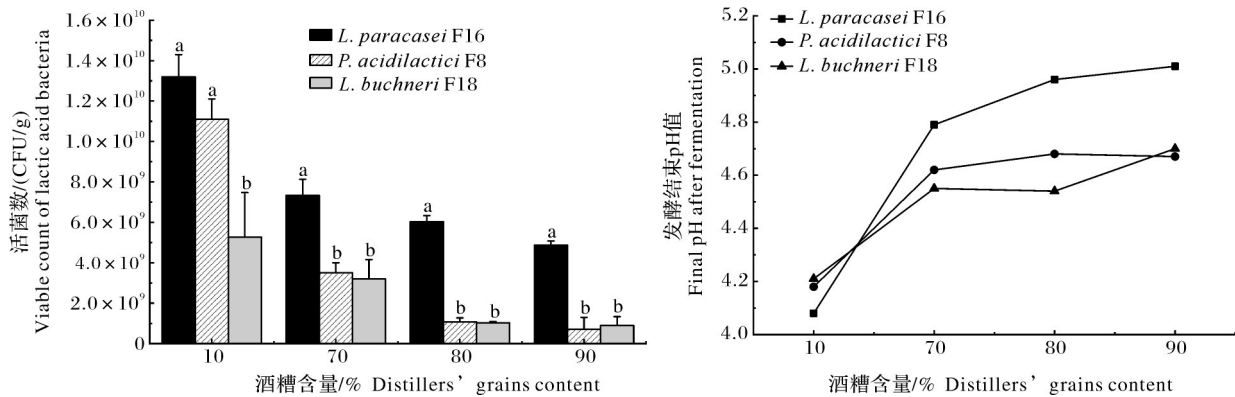


图6 酒糟含量对乳酸菌固态发酵活菌数的影响

Fig.6 Effect of distiller's Grains content on viable counts of lactic acid bacteria in solid-state fermentation

能,其活菌数在所有测试条件下均显著优于其他菌株。

2.8 优良菌株的形态特征与生长动力学分析

如图7所示,乳酸片球菌F8菌落呈乳白色、圆形光滑,革兰氏染色为紫色球状;副干酪乳杆菌F16菌落乳白、隆起光滑,菌体为长杆状;布氏乳杆菌F18菌

落较小、乳黄色,细胞呈杆状。生长曲线(图8)显示,乳酸片球菌F8与副干酪乳杆菌F16均在2 h内进入对数期,副干酪乳杆菌F16的对数生长期持续至18 h,平台期出现最晚,显示其更强的生长潜力与耐力;布氏乳杆菌F18则延滞期较长(8 h),后续生长潜力与副干酪乳杆菌F16接近。

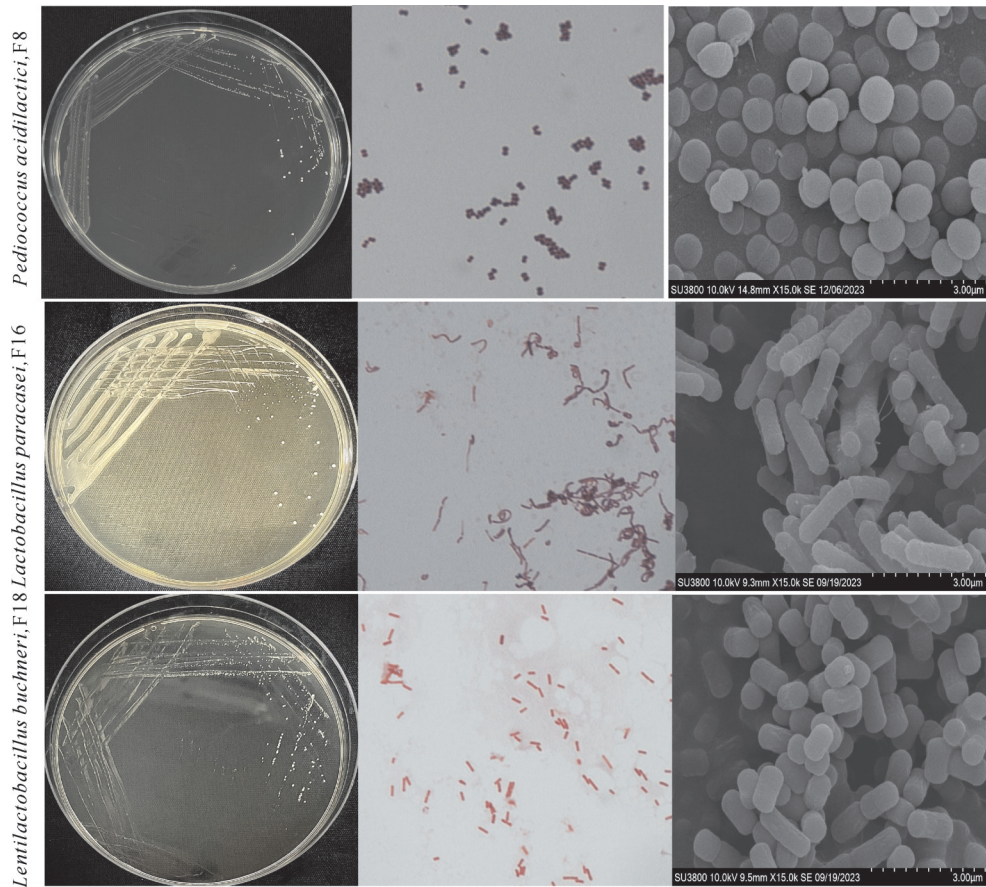


图7 3株乳酸菌的菌落形态、细菌染色及扫描电镜图

Fig.7 Colony morphology, Gram staining and scanning electron microscopy (SEM) of three lactic acid bacteria strains

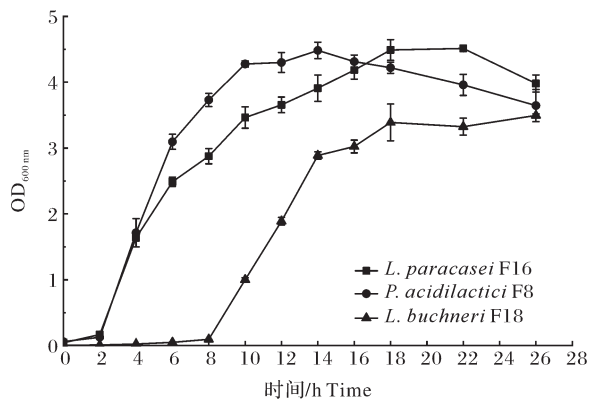


图8 3株乳酸菌在MRS液体培养基中的生长曲线

Fig.8 Growth curves of three lactic acid bacteria strains in MRS liquid medium

3 讨论

3.1 酒糟源乳酸菌的多样性及耐受性能

本研究从酱香型白酒糟中分离鉴定出24株乳酸菌,分属5个物种,这一结果与前期关于白酒糟微生物群落的研究基本一致^[24]。值得注意的是,在筛选过程中,布氏乳杆菌F18与副干酪乳杆菌F16在耐受性方面表现尤为突出。乳酸片球菌F8与布氏乳杆菌F18在8%乙醇胁迫下仍能维持较高的存活率;副干酪乳杆菌F16在pH 3.0条件下处理4 h后存活率仍维持在约50%,虽略低于李元元等^[25]报道的罗伊氏乳杆菌L81在pH 2.5下的存活率(约60%),但在更

接近酒糟实际酸度(pH 3.5~4.5)的环境下仍表现出良好的适应性,显示出其在酱香型白酒糟高酸环境中的潜在优势。这表明白酒糟特有的高酸高乙醇环境可能作为一种强大的自然选择压力,富集了这些具备特殊耐受表型的菌株。电镜观察结果(图7)显示,这些耐受性优良的菌株在正常培养条件下细胞形态完整、表面光滑,提示其细胞结构在胁迫条件下可能保持了较好的稳定性。

3.2 菌株安全性与生长特性综合评价

安全性评估结果表明,所有测试菌株均无溶血活性,且在药敏试验中对多数抗生素(如利福平、万古霉素、红霉素等)表现敏感,仅对氨基糖苷类抗生素(如链霉素、卡那霉素)表现耐药或中介,符合多数乳酸菌的耐药特征。此外,生长曲线分析表明,副干酪乳杆菌F16具有更长的对数生长期和更高的平台期菌体密度,进一步支持其在固态发酵中的优势表现^[26]。

3.3 固态发酵性能的优化空间

在固态发酵性能方面,副干酪乳杆菌F16在70%酒糟基质中发酵48 h后活菌数达 7.33×10^9 CFU/g,展现出优异的高密度发酵能力。值得注意的是,本研究采用的发酵基质中酒糟比例高达70%~90%,条件更为苛刻。而同类研究多通过添加大量辅料(如玉米粉、麸皮)以优化发酵环境,如梅世慧等^[27]采用的基料中酒糟占比为77%。本研究的副干酪乳杆菌F16菌株在更高比例的酒糟环境中仍能维持高活菌数,显示出其在简化工艺、降低发酵成本方面更具应用潜力。

3.4 应用前景与局限性

本研究立足于解决酱香型白酒糟的资源化难题,致力于挖掘其特殊生境中的微生物资源,通过分级筛选策略成功获得了性能优良的乳酸菌菌株,实现了从理论价值(丰富菌种库、证实生境独特性)到应用价值(提供核心菌种、奠定菌剂开发基础)的统一。其中,副干酪乳杆菌F16在酒糟资源化中潜力显著;其优异的耐受性、高发酵活性及良好的安全性支持其作为酒糟饲料发酵菌剂,有效抑制腐败菌并提升饲料营养价值,同时,其环境适应性也为其在低度酒酿造与功能产物(有机酸、细菌素、EPS等)生产中的应用提供可能。

然而,本研究仍存在若干局限:菌株遗传稳定性与耐药基因机制尚未系统评估;酒糟高纤维含量可能限制部分菌株生长,需通过辅料添加、酶解或混菌

发酵等工艺优化;耐受机制尚未在分子水平阐明;从实验室放大至产业化还需克服传质、过程控制与成本等挑战。

参考文献 References

- [1] 杨志波. 酱香型白酒糟资源化综合利用的研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2016. YANG Z B. Maotai-flavor liquor vinasse resource comprehensive utilization research [D]. Guiyang: Guizhou University, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [2] 白成松, 陈莉, 卢红梅, 等. 茅台地区酱香型酒糟中高温放线菌的分离鉴定[J]. 食品工业科技, 2017, 38(8): 199-202. BAI C S, CHEN L, LU H M, et al. Isolation and identification of thermoactinomycete from Moutai-flavor vinasse in Moutai region [J]. Science and technology of food industry, 2017, 38(8): 199-202 (in Chinese with English abstract).
- [3] 邢军梅. 微波结合 *P. chrysosporium* 预处理对酒糟酶解糖化效果的影响[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2017. XING J M. Combined effect of microwave and *P. chrysosporium* pretreatments of distillers grains for fermentable sugars by enzymatic hydrolysis [D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2017 (in Chinese with English abstract).
- [4] 董亚楠, 陆锐, 尹苗, 等. 微生物发酵饲料的作用机制及其在生猪健康养殖中的应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2025(10): 26-32. DONG Y N, LU R, YIN M, et al. Mechanisms of microbial fermented feed and its application in healthy swine farming [J]. Heilongjiang animal science and veterinary medicine, 2025 (10): 26-32 (in Chinese with English abstract).
- [5] 张应莲, 黄永光. 酱香大曲中 *Geotrichum candidum* MTBD 菌株筛选及发酵产物研究[J]. 酿酒科技, 2012(12): 31-33. ZHANG Y L, HUANG Y G. Screening of *Geotrichum candidum* MTBD strain from Jiang-flavor Daqu and study on its fermentation products [J]. Liquor-making science & technology, 2012(12): 31-33 (in Chinese with English abstract).
- [6] 唐玉明, 任道群, 姚万春, 等. 酱香型酒糟堆过程温度和微生物区系变化及其规律性[J]. 酿酒科技, 2007(5): 54-58. TANG Y M, REN D Q, YAO W C, et al. The change rules of temperature and microflora during the stacking of Maotai-flavor fermenting grains [J]. Liquor-making science & technology, 2007(5): 54-58 (in Chinese with English abstract).
- [7] 刘兰兰. 酱香型白酒糟核心微生物菌群的解析及分离筛选研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2023. LIU L L. Research on the analysis and isolation screening of core microbial flora in fermented grains of sauce-flavored Baijiu [D]. Guiyang: Guizhou University, 2023 (in Chinese with English abstract).
- [8] 李俊, 周婧, 章漳, 等. 一种泛喜马拉雅地区鸡爪谷酒糟来源类干酪乳杆菌的发酵产物制备及其应用: CN114073659A [P]. 2022-02-22. LI J, ZHOU J, ZHANG Z, et al. Fermenta-

- tion product preparation and application of *Lactobacillus casei* from distiller's yeast of Chiang-Hua grain wine in the Pan-Himalayan Region: CN114073659A [P]. 2022-02-22 (in Chinese).
- [9] 吴天祥, 杨海龙, 石贵阳, 等. 玉米酒糟乳酸菌发酵饲料培养基优化研究[J]. 饲料研究, 2003, 26(12): 6-8. WU T X, YANG H L, SHI G Y, et al. Study on optimization of culture medium for lactic acid fermentation in vinasse feed from corn distiller's grains[J]. Feed research, 2003, 26(12): 6-8 (in Chinese).
- [10] 张小利, 黄银峰, 张鹏翔, 等. 菌酶协同转化白酒丢糟制备微晶纤维素及Nisin工艺条件优化[J]. 中国酿造, 2023, 42(12): 130-136. ZHANG X L, HUANG Y F, ZHANG P X, et al. Optimization of process condition for the preparation of MCC and Nisin from Baijiu distiller's grains by enzyme-bacterium synergism[J]. China brewing, 2023, 42(12): 130-136 (in Chinese with English abstract).
- [11] 周卫华. 食品检验中乳酸菌鉴定方法的探讨[J]. 中小企业管理与科技(中旬刊), 2018(6): 169-170. ZHOU W H. Discussion on the identification method of *Lactobacillus* in food inspection[J]. Management & technology of SME, 2018(6): 169-170 (in Chinese with English abstract).
- [12] 张甜, 刘艳全, 丁真真, 等. 传统发酵酸乳中乳酸菌的分离鉴定[J]. 中国调味品, 2020, 45(2): 40-42. ZHANG T, LIU Y Q, DING Z Z, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional fermented yogurt [J]. China condiment, 2020, 45(2): 40-42 (in Chinese).
- [13] 杨亚洁, 付东青, 王旭哲, 等. 油莎豆茎叶青贮饲料中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 饲料研究, 2024, 47(16): 72-78. YANG Y J, FU D Q, WANG X Z, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from *Cyperus esculentus* L. stem and leaf silage[J]. Feed research, 2024, 47(16): 72-78 (in Chinese with English abstract).
- [14] 代牡兰, 锡林高娃, 吴金花, 等. 内蒙古地区传统发酵乳中乳酸菌的分离与鉴定[J]. 中国乳品工业, 2023, 51(5): 31-35. DAI M L, XI L, WU J H, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional fermented milk in Inner Mongolia[J]. China dairy industry, 2023, 51(5): 31-35 (in Chinese).
- [15] 麦日艳古·亚生, 伊力米热·热夏提, 努尔古丽·热合曼. 北疆传统发酵生奶酪中乳酸菌的耐受性及益生特性测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(5): 2044-2062. MAIRIYANGU Y, YILIMIRE R, NUERGULI R. Tolerance and probiotic characteristics of lactic acid bacteria in traditional fermented raw cheese in Northern Xinjiang[J]. Microbiology China, 2023, 50(5): 2044-2062 (in Chinese with English abstract).
- [16] 张霖, 夏程程, 王文悦, 等. 乳酸菌的乙醇耐受机制及其在食醋生产中的应用[J]. 现代食品科技, 2024, 40(3): 91-101. ZHANG L, XIA C C, WANG W Y, et al. Ethanol tolerance mechanism of lactic acid bacteria and its application in vinegar fermentation[J]. Modern food science and technology, 2024, 40(3): 91-101 (in Chinese with English abstract).
- [17] YANG X P, TENG K L, ZHANG J, et al. Transcriptome responses of *Lactobacillus acetotolerans* F28 to a short and long term ethanol stress [J/OL]. Scientific reports, 2017, 7: 2650 [2025-07-04]. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02975-8>.
- [18] 牟佳欣. 犬源产维生素B₁₂乳酸菌的分离鉴定、生物学特性、培养条件优化及其安全性评价[D]. 南京: 南京农业大学, 2020. MU J X. Isolation and identification, biological characteristics, optimization of culture conditions and safety evaluation of canine producing vitamin B₁₂ lactic acid bacteria [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [19] 张一爽. 副干酪乳杆菌抗生素耐药性分析及蛋白酶活性评价[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2020. ZHANG Y S. Evaluation of antibiotic resistance and proteolytic ability of *Lactobacillus paracasei* strains [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2020 (in Chinese with English abstract).
- [20] 董贵, 张雪, 包文武, 等. 奶牛乳源病原菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 中国奶牛, 2025(7): 58-62. DONG G, ZHANG X, BAO W W, et al. Isolation, identification and drug susceptibility test of milk-derived pathogens from dairy cows [J]. China dairy cattle, 2025(7): 58-62 (in Chinese with English abstract).
- [21] 蒋金辰, 徐琰斐, 单建军, 等. 鱼菜共生系统中乳酸菌的筛选及其发酵矿化应用[J]. 农业工程学报, 2024, 40(11): 119-127. JIANG J C, XU Y F, SHAN J J, et al. Screening lactic acid bacteria for fermentation and mineralization in aquaponic system [J]. Transactions of the CSAE, 2024, 40(11): 119-127 (in Chinese with English abstract).
- [22] 付瑞燕, 徐倩. 一种快速测定乳酸菌胁迫菌株存活率的方法: CN106244668B [P]. 2019-04-30. FU R Y, XU Q. A method and process for rapid determination of survival rate of lactic acid bacteria under stress: CN106244668B [P]. 2019-04-30 (in Chinese).
- [23] 王盼, 李林峰, 黄文艺, 等. 副干酪乳杆菌Lab5后生元特性及其在冷藏杜黑猪肉保鲜中的应用[J]. 食品工业科技, 2026, 47(4): 238-247. WANG P, LI L F, HUANG W Y, et al. Characteristics of postbiotics *Lactocaseibacillus paracasei* Lab5 and its application in the preservation of refrigerated Duhei pork [J]. Science and technology of food industry, 2026, 47(4): 238-247 (in Chinese with English abstract).
- [24] 钟正丹, 何义国, 赵兴秀, 等. 白酒酒糟中抗氧化乳酸菌的筛选及培养基优化[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(7): 533-536. ZHONG Z D, HE Y G, ZHAO X X, et al. Screening of antioxidant lactic acid bacteria from distiller's grains and optimization of culture medium [J]. Jiangsu agricultural sciences, 2016, 44(7): 533-536 (in Chinese).
- [25] 李元元, 李鑫, 何泽纯, 等. 牛源乳酸菌的分离鉴定及体外益生特性研究[J]. 动物营养学报, 2024, 36(1): 626-636. LI Y

- Y, LI X, HE Z C, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria from calves and their probiotic properties *in vitro* [J]. Chinese journal of animal nutrition, 2024, 36(1): 626-636 (in Chinese with English abstract).
- [26] NAWAZ M, WANG J, ZHOU A P, et al. Characterization and transfer of antibiotic resistance in lactic acid bacteria from fermented food products [J]. Current microbiology, 2011, 62(3): 1081-1089.
- [27] 梅世慧, 朱鸣鸣, 王微, 等. 复合益生菌固态发酵白酒糟条件的研究 [J]. 动物营养学报, 2023, 35(1): 632-642. MEI S H, ZHU M M, WANG W, et al. Conditions of solid state fermentation of distiller's grains with compound probiotics [J]. Chinese journal of animal nutrition, 2023, 35(1): 632-642 (in Chinese with English abstract).

Isolation, identification, and fermentation performance of lactic acid bacteria from sauce-flavor Baijiu distillers' grains

LU Chunqi¹, FANG Hao^{2,3}, XU Hao¹, YU Hang^{3,4},
JIANG Youfeng¹, LIANG Yunxiang^{2,3}, WU Wei¹, LI Yingjun^{2,3}

1. Guizhou Moutai Distillery (Group) Circular Economy Industrial Investment and Development Co., Ltd., Zunyi 563000, China;
2. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. National Key Laboratory of Agricultural Microbial Resources Discovery and Utilization, Wuhan 430070, China;
4. College of Animal Science and Technology/College of Veterinary Medical, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A hierarchical screening strategy was used to isolate, identify, and evaluate the fermentation performance of lactic acid bacteria from the distiller's grains to develop a specialized fermentation inoculant suitable for Maotai sauce-flavor Baijiu distiller's grains. The acid-producing strains were initially screened with the bromocresol purple plate method, followed by identification through morphological observation, Gram staining, and 16S rRNA sequencing. The ethanol tolerance (5%-15%) of the strains was determined. The acid resistance (pH 2.0-6.0), temperature adaptability (20-60 °C), *in vitro* safety (hemolysis and drug sensitivity), and solid-state fermentation performance of the strains were systematically evaluated. The results showed that 24 lactic acid bacteria strains isolated and identified from the distiller's grains were belonged to five species including *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lentilactobacillus buchneri*, and *Lactobacillus acidophilus*. The survival rate of *Pediococcus acidilactici* F8, *Lactobacillus paracasei* F16, and *Lentilactobacillus buchneri* F18 remained at approximately 10% under the stress of 8% ethanol. Most strains maintained a survival rate exceeding 60% after 2 hours of treatment at pH 3.0-6.0. The dominant strains grew well at 30-37 °C, exhibited no hemolytic activity, and were sensitive to most antibiotics. The results of solid-state fermentation showed that the viable count of *Lactobacillus paracasei* F16 reached 7.33×10^9 CFU/g after 48 hours of fermentation in a medium containing 70% distiller's grains, significantly higher than that of other strains. This study successfully screened three lactic acid bacteria strains with excellent resistance to stress, safety, and efficient fermentation performance. It will provide core microbial resources and technical support for the high-value utilization of Maotai sauce-flavor Baijiu distiller's grains and the development of specialized fermentation inoculants.

Keywords sauce-flavor Baijiu distiller's grains; lactic acid bacteria; acid tolerance; fermentation; lactic acid bacteria starter culture; safety evaluation

(责任编辑:陆文昌)